

# 實驗系統和方法

EXPERIMENTAL SYSTEMS AND METHODS

# 20

## 介紹 (INTRODUCTION)

在前面的章節中，我們談到了幾種幫助我們理解先天免疫和適應性免疫的技術和分析。在本章中，我們將更詳細地討論研究實驗室和檢驗實驗室中使用的實驗系統和方法，正如第 6 章所討論的，一些免疫學方法完全基於抗體的運用（如血清學方法），現在還有其他採用分子生物學、基因工程、細胞培養技術和動物模式等方法，這些方法極大化地促進了我們對生理學和免疫系統的病理生理學的理解，自 2000 年人類基因體定序，以及對微生物基因體的定序之後，使用生物資訊學（所謂的計算機分析）的方法也已成爲研究我們免疫系統的強大工具，使用來自**基因體 (genomic)** 和**蛋白質體 (proteomic)** 資料庫的資訊、強大的軟體工具和演算法，這些技術爲免疫學領域帶來了很打的幫助，尤其是對於辨識病原體表達的免疫原性頂位的尤其重要，這些頂位可以作爲候選疫苗進一步研究，雖然這個主題超出了本章的範圍，但重要的是要記住，免疫學領域的未來發展將來自體外、體內和生物資訊方法的結合。

本章會由抗原－抗體的動態結合開始介紹免疫分析，免疫分析是一系列高選擇性生物分析方法的基礎，這些方法通過使用抗體或抗原作爲生物辨識來測量溶液中從小分子到大分子的分析物的存在或濃度。

## 免疫分析 (IMMUNOASSAYS)

### 直接結合免疫分析 (Direct-Binding Immunoassays)

因為有了非放射性替代方案，所以放射性測試已不再常規執行。但放射免疫分析 (radioimmunoassay，簡稱 RIA) 使用放射性同位素標記分子並能夠測量極少量的抗原、抗體或抗原－抗體複合體，因為人們是透過測量這些標記分子的放射性而不是化學分析來進行定量，使得檢測的靈敏度因此提高了幾個數量級，羅莎琳·耶洛 (Rosalyn Yalow) 因開發了這種可用於激素檢測以及生物體液中低濃度其他物質的檢測方法，且有在應用上的高度靈敏，而獲得諾貝爾獎。

放射免疫分析的原理如圖 20.1 所示，已知量的放射性標記抗原與有限量的抗體反應，使溶液中包含有與抗體結合的標記抗原以及一些未結合的標記抗原，再將與抗體結合的抗原與游離抗原分離後，測定與抗體結合的放射量。

我們可利用該測試繼續執行類似的步驟，其中將相同數量的標記抗原與未標記抗原預混合 (圖 20.2)，混合物與之前相同量的抗體反應，將與抗體結合的抗原與未結合的抗原分離，未標記的抗原與標記的抗原競爭抗體，因此與未標記抗原不存在的情況相比，更少的標記抗原與抗體結合，反應混合物中未標記的抗原越多，抗體結合的放射性標記的抗原與游離的、放射性標記的抗原的比例就越小，該比率可以繪製為用於競爭的未標記抗原濃度的函數，並用於確定溶液中未知的抗原濃度。將結合與游離放射性的比率與在沒有未標記抗原的情況下獲得的比率進行比較 (後者的值設置為 100%)。

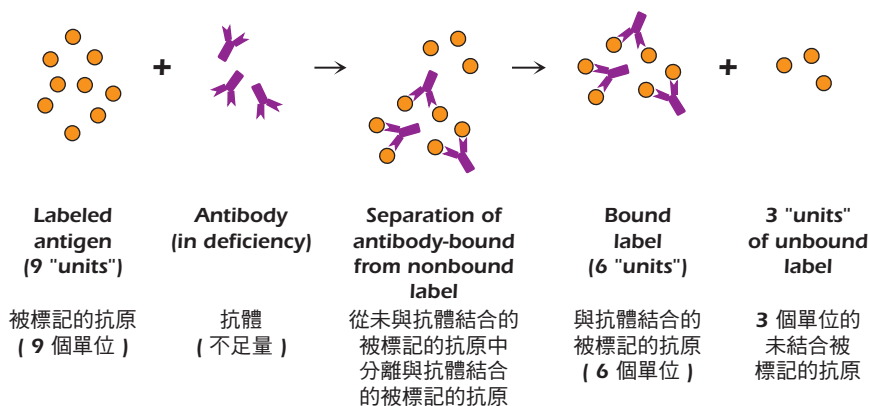


圖 20.1 恆定量抗體和標記的抗原反應後與抗體結合的標記量。

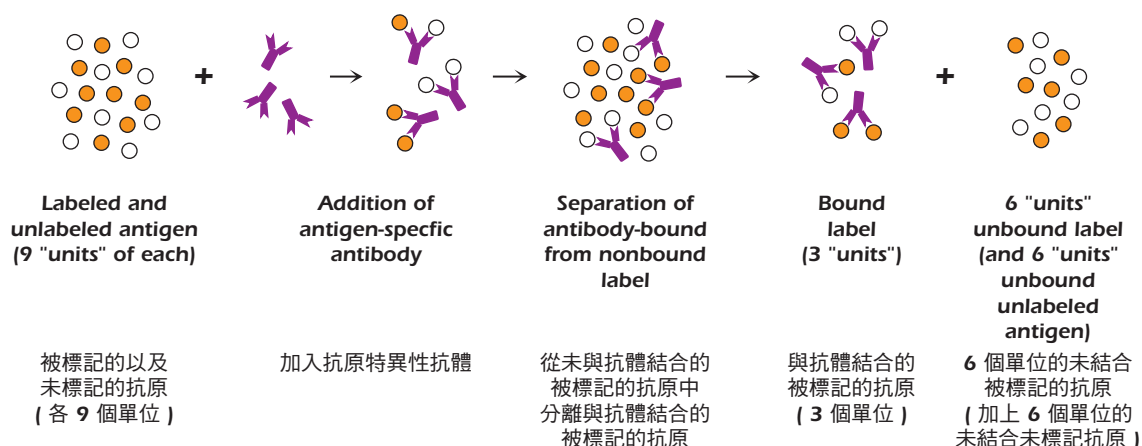


圖 20.2 放射免疫分析，基於非標記和標記的抗原對抗體的競爭。

如上所述，進行放射免疫分析的一個重要步驟是將游離抗原和與抗體結合的抗原分離，根據抗原的不同，這種分離可以通過多種方式實現，其中最主要的是抗免疫球蛋白分離法。

免疫球蛋白分離法是基於以下原理：在加入抗免疫球蛋白抗體後，與免疫球蛋白結合的抗原（標記或未標記）將因而沉澱，因此只有未結合的抗原保留在上清液中，放射免疫分析通常使用針對所需抗原的兔子抗體，這些兔子抗體－抗原複合體可以通過添加針對兔子免疫球蛋白的山羊抗體加以沉澱。

由於放射免疫分析所需的抗原和抗體量極少，抗原－抗體複合體與抗免疫球蛋白反應後只會形成微小的沉澱，即使不是不可能，也很難通過常規方法定量回收這些沉澱物，以確定它們的放射性，為了克服這個問題，通常在反應混合物中加入對抗原沒有特异性的免疫球蛋白，從而將總體免疫球蛋白的量增加到可以容易被抗免疫球蛋白沉澱並定量回收的量。這種沉澱物主要由放射性抗原不結合的非特异性免疫球蛋白組成，然而它們也含有極少量的抗原特异性免疫球蛋白和與其結合的放射性抗原。

將與抗體結合的抗原複合體與游離抗原分離的另一種方法是基於免疫球蛋白在含有 33% 飽和硫酸銨的溶液中變得不溶和沉澱這現象，如果單獨的抗原不在 33% 硫酸銨中沉澱，添加 33% 硫酸銨將導致與抗原複合的抗體沉澱，在溶液中留下游離抗原；同樣地，與抗原（或游離抗體）反應的抗體量很少，無法形成足夠沉澱，如放射免疫分析所述，其中抗免疫球蛋白用於從游離抗原中分離與抗體結合的抗

原，將足量的非特異性免疫球蛋白添加到混合物中，在 33% 飽和硫酸銨下會形成明顯的沉澱物，從而能夠將游離抗原與結合抗體的抗原分離。

## 固相免疫分析 (Solid-Phase Immunoassays)

固相免疫分析是目前最廣泛應用的免疫學技術之一，現已實現自動化，在臨床醫學中廣泛用於抗原或抗體的檢測，一個很好的例子是使用固相免疫分析檢測人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus，簡稱 HIV) (見第 16 章)。

固相免疫分析利用各種塑料 (如聚乙烯，PVC；或聚苯乙烯，PS) 的特性將蛋白質 (抗原) 單層分子吸附到其表面，雖然被吸附的分子可能會失去一些抗原決定位，但仍有足夠的分子保持不變仍然可以與相應的抗體發生反應，這些與吸附在塑料上的抗原結合的抗體的存在可以通過使用與酵素 (如過氧化物酶，peroxidase) 連結的抗體來檢測，當使用顯色基質時，含有與抗原結合的酵素連結抗體的孔盤將顯示可以定量檢測的顏色變化 (圖 20.3)，顏色越深表示孔盤中吸附的抗原濃度越高；或者，可以使用針對吸附抗原的未標記抗體，然後添加酵素連結抗免疫球蛋白，該測試稱為酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay，簡稱 ELISA)，螢光基質也可用於此方法，並可提高靈敏度。

應該強調的是，在用抗原被吸附至塑料表面後，必須堵塞任何剩餘可能尚未吸附抗原的塑料表面，以防止其吸附其他試劑，最重要的是要防止其吸附標記試劑，

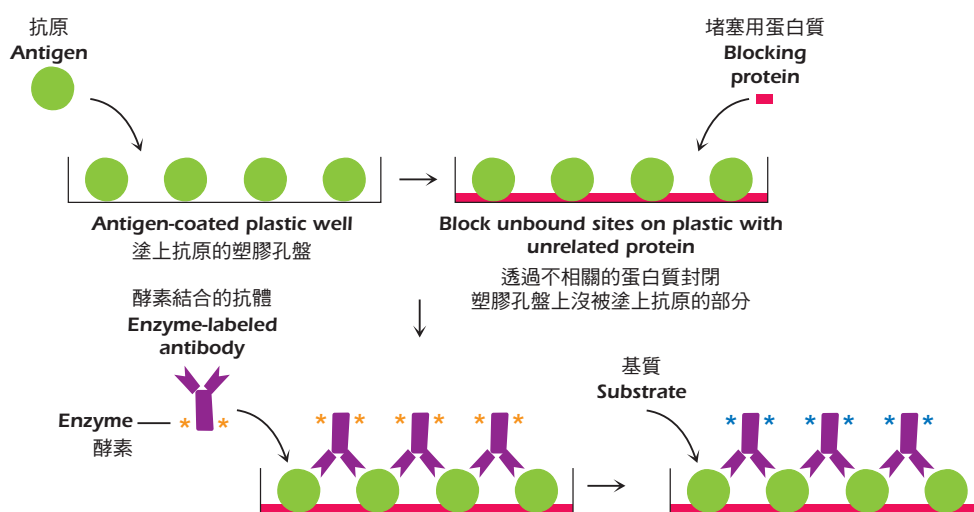


圖 20.3 酵素連結免疫吸附分析法的示意圖，其中使用直接塗有抗原的塑膠孔盤。

這種阻斷是在吸附抗原後用高濃度的無關蛋白質 (如明膠, **gelatin**) 填覆塑料表面來完成。

固相免疫分析可用於針對檢測塑料表面特定抗原的抗體的存在, 由於塑膠孔盤上通常塗有相對大量的抗原, 因此與抗原結合的抗體量越高, 使得最後與抗體結合的被標記的抗免疫球蛋白的量就越高, 因此重要的是始終使用過量的被標記的抗免疫球蛋白以確保飽和。

固相免疫分析可用於抗原的定性或定量分析, 例如: 在將抗血清添加到塗有抗原的塑膠孔盤中之前, 先將抗血清與不同的已知量的抗原混合來進行檢測, 這個步驟使抗體先與可溶性抗原結合, 降低了游離抗體與吸附在塑料表面抗原的結合, 因此再加入塑膠孔盤前與抗體混合的可溶性抗原濃度越高, 之後能與塑膠孔盤中的抗原結合的抗體量就越少, 進而使能結合的標記抗免疫球蛋白數量越少, 最終可以透過繪製結合標記量的減少的函數, 如此便可以從已知抗原濃度所造成的減少量比較未知濃度抗原的減少量而推得待測檢體的濃度。

## 免疫墨點法 / 西方墨點法 (Immunoblotting/Western Blotting)

免疫墨點法 (**immunoblotting**), 也稱為西方墨點法 (**Western blotting**) 是一種用於分析蛋白質混合物中特定蛋白質的技術, 西方墨點法一詞是來自於一個文字遊戲, 因為埃德溫·薩瑟恩爵士 (Sir Edwin Southern) 發明了南方墨點法 (**Southern blotting**), 那是一種檢測特定 DNA 序列的方法, 而西方墨點法和北方墨點法 (**Northern blotting**, 用於 RNA 檢測) 就是依照這個模式命名。

免疫墨點法是因為使用抗體去檢測其特異性抗原, 蛋白質混合物先以凝膠電泳像是 SDS- 聚丙烯醯胺凝膠 (**sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis**, 簡稱 **SDS-PAGE**)、非變性聚丙烯醯胺凝膠 (**native PAGE**)、等電聚焦 (**isoelectric focusing**, 簡稱 **IEF**)、二維膠體電泳 (**2D gel electrophoresis**, 簡稱 **2-DE**), 以根據蛋白質大小、電荷或蛋白質中的其他差異進行帶狀分離, 然後將分離的蛋白質帶轉移 (轉漬到) 到載體膜上, 例如: 硝化纖維 (**nitrocellulose**)、尼龍 (**nylon**) 或聚偏二氟乙烯 (**polyvinylidene difluoride**, 簡稱 **PVDF**), 並保持相同的帶狀形式, 然後這些轉漬蛋白可用抗體結合進行檢測, 通會使用一級抗體標定特定蛋白質, 再使用與酵素連結的二級抗體去標定一級抗體, 之後再加入適當的基質產生

可檢測的信號，顯色基質在膜上產生沉澱，導致肉眼可見的比色變化；為了提高靈敏度，一種高度靈敏的檢測方法使用**化學發光基質 (chemiluminescent substrate)**，該基質為與抗體上連結的酵素反應後產生特定的光化作用，再使用底片捕獲這些光訊號。

或者，也可以使用螢光標記的抗體，但這需要使用能夠偵測螢光訊號的儀器進行檢測。

## 免疫螢光染色 (IMMUNOFLUORESCENCE)

螢光化合物在被波長較短的光激發時具有發射特定波長光的特性，免疫螢光是一種通過使用螢光標記的抗體來標定抗原的方法，最初是由庫姆斯 (Coombs) 提出，將抗體與螢光基團共價連接，抗體活性沒有任何明顯變化。

一種廣泛用於免疫學的螢光化合物是**螢光異硫氰酸鹽 (fluorescein isothiocyanate，簡稱 FITC)**，它在被紫外線激發時會發出可見的綠色螢光，它也很容易與游離胺基耦合；另一種廣泛使用的螢光化合物是**藻紅蛋白 (phycoerythrin，簡稱 PE)**，它發出紅色螢光並且也很容易與游離胺基耦合，配備有 UV 光源的螢光顯微鏡可將顯微標本上的螢光抗體可視化，並且螢光抗體可廣泛地用於標定各種組織或微生物上的抗原。

有兩個重要且相關的分析方法會使用螢光抗體：直接免疫螢光染色和間接免疫螢光染色。

### 直接免疫螢光染色 (Direct Immunofluorescence)

直接免疫螢光染色主要用於檢測抗原，使用螢光標記的特異性抗體與目標組織 (或微生物) 發生反應，在**全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus，簡稱 SLE)** 的情況下，它在臨床上廣泛用於辨識淋巴球亞群和證明特定蛋白質 (如自體抗體、補體) 在某些組織 (如腎臟和皮膚) 中的沉積 (參見第 12 章)。

### 間接免疫螢光染色 (Indirect Immunofluorescence)

間接免疫螢光染色必須先讓目標抗原與未標記的特異性抗體發生反應，之後再

用螢光標記的抗免疫球蛋白抗體進行後續的螢光標記。

間接免疫螢光染色比直接法更廣泛應用，因為單一螢光抗免疫球蛋白抗體可用於標定許多不同特異性的抗體，此外，由於抗免疫球蛋白抗體含有針對特定免疫球蛋白上許多頂位的抗體，因此使用螢光抗免疫球蛋白抗體可顯著放大螢光信號，使用間接免疫螢光染色的一個很好的例子是在全身性紅斑性狼瘡病例中篩檢患者血清中的抗 DNA 抗體。

## 流式細胞儀 (FLOW CYTOMETRY)

基於抗原特異性螢光抗體的使用，人們開發了一種非常強大的工具，這就是流式細胞分析 (**flow cytometric analysis**) 和細胞分選 (**cell sorting**) 的技術，流式細胞儀可以作為分析儀器使用，可以測量細胞的大小、顆粒性、細胞表面或細胞內蛋白質的表達；也可以作為執行所有這些操作並且還可以將分選不同細胞族群的儀器，也就是作為細胞分選儀使用，在進行細胞分選時，被特定螢光抗體標記的細胞懸液通過一個裝置，形成一串小液滴，每個液滴包含一個細胞，當標記的細胞存在於液滴中時，這些液滴會通過紫外光雷射光束並散射螢光訊號，螢光訊號被後面的螢光偵測器接受，帶有特定訊號的液滴接著會被賦予電性，導致液滴在電磁場中發生偏轉 (圖 20.4)，因此當所有液滴落下經過雷射光束時，它們會被計數並根據它們是帶有特定訊號進行分類 (如未標記與標記)。每個細胞上螢光物質的染色強度反映了細胞上特定抗原的表達量，可以通過複雜的電子設備來確定。

透過這樣的儀器，現在人們可以快速從淋巴細胞庫中分辨各個細胞族群，依據細胞表面分子的差異表達、細胞表面分子的相對表現量、細胞大小分布、各種細胞的比例；還可以使用該設備進行八種或更多不同螢光標記染色的細胞集合進行分選，獲得純化後的特定細胞類型。這種技術的一種變體是使用與磁珠耦合的螢光抗體來分離細胞族群，可以通過磁鐵將與螢光抗體結合的細胞與未染色的細胞分開，流式細胞分選技術 (**fluorescence-activated cell sorting**，簡稱 **FACS**) 和磁珠分選技術 (**magnetic-activated cell sorting**，簡稱 **MACS**) 都可以分離出非常稀有的細胞，例如：造血幹細胞。

對細胞進行表現型分型和分選的最常用方法是使用抗體，這些抗體會辨識稱為

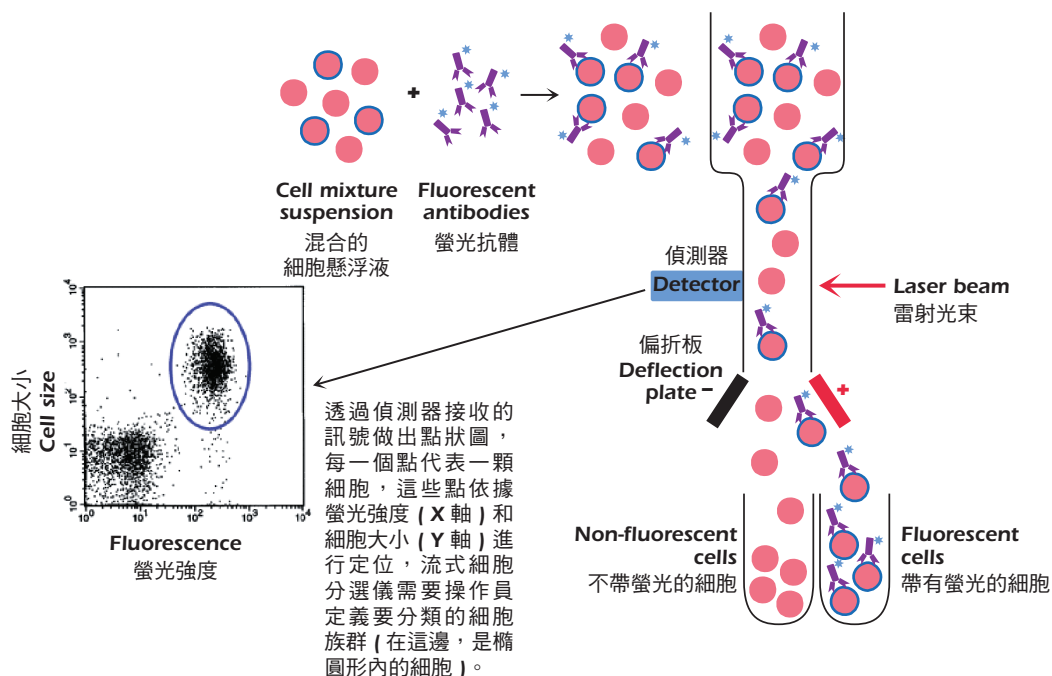


圖 20.4 流式細胞分選技術的示意圖。

分化群 (clusters of differentiation, 簡稱 CD) 抗原的細胞表面蛋白，分化群命名法起源於使用單株抗體 (在本章後面討論) 來進行細胞表現型的研究，研究發現細胞表面標誌物 (分化群抗原) 與不同的發育階段相關，此外這些蛋白質具有細胞生理所需的重要生物學功能，B 細胞和 T 細胞的發育階段以及這些細胞的功能亞群現在可以根據其分化群的表達進行表現型分析，然而，同樣值得注意的是，特定分子的表面表達可能並不只對一個細胞或是對一個細胞譜系具有特異性；但是，我們可以由分化群的表現組合分辨出細胞類型，因此，還是可以用細胞表面的分子組合來了解細胞的純度和特徵。

出於實用目的，分化群採用英文首字母縮寫後跟一個數字，用於代表特定的細胞表面蛋白，分化群編號是由國際免疫學會聯合會命名委員會 (Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Sciences) 分配，附錄中列出了一些 B 細胞、各種 T 細胞亞群、其他細胞表達的更重要分化群抗原。



## 免疫吸收和免疫吸附 (IMMUNOABSORPTION AND IMMUNOADSORPTION)

由於抗原和抗體之間的特異性結合，可以從溶液中的抗原混合物中捕獲或選擇性地去除抗體所針對的抗原，同樣地，可以使用特定抗原從抗體混合物中捕獲或選擇性去除抗原特異性抗體。

有兩種通用方法可以進行這種去除，這兩個方法是類似的，在其中一種方法中，吸收是用溶液中的兩種試劑完成的**免疫吸收 (immunoabsorption)**，而在第二種方法中，它是用一種試劑附著在不溶性支持物上**免疫吸附 (immunoadsorption)**進行的。免疫吸附具有特殊的價值，因為可以通過解離抗原－抗體複合體，例如：降低 pH (鹽酸－甘胺酸或乙酸，pH 2~3) 或添加離散離子，可從複合體中回收吸附的物質，這使得人們能夠有效純化感興趣的抗原或抗體。

## 細胞檢測 (CELLULAR ASSAYS)

細胞檢測用於評估和研究免疫系統的細胞成分，其中包括用於測量淋巴球功能的常規方法，像是檢測 B 細胞對抗原刺激或裂殖素刺激的反應可在臨床上用於評估體液免疫能力，在實驗環境中，這些檢測有助於我們了解與 B 細胞活化相關的調控和分子機制；同樣地，T 細胞增生、效應反應、細胞激素種類分泌可用在臨床和實驗上的 T 細胞功能檢測，T 細胞分析對我們理解 T 細胞功能多樣性和鑑定屬於特定亞群的細胞產生的許多細胞激素做出了重大貢獻。

## 淋巴球功能檢測 (Assays of Lymphocyte Function)

用於評估淋巴球功能的檢測通常試圖回答以下問題之一：(1) B 細胞或 T 細胞是否對於引發細胞增生反應的裂殖素刺激有正常反應？(2) 裂殖素或抗原的刺激是否會導致抗體產生 (對於 B 細胞) 或細胞激素產生 (對於 T 細胞)？此外，鑑於 T 細胞的功能異質性，T 細胞檢測也可用於評估特定亞群的功能完整性，這在疑似免疫缺陷病患者的臨床評估中特別有用 (見第 16 章)，在檢測 T 輔助細胞的情況下，接受 T 細胞幫助的目標細胞通常決定要測量的功能參數，例如：在測試 T 細胞幫助誘導抗體反應的能力的檢測中，目標細胞族群可能是 B 細胞，在這個例子中，該測

定將定量產生的抗體量；同樣地，如果有人想知道 T 細胞是否提供活化巨噬細胞所需的最佳幫助，則測量的參數將集中在與這些吞噬細胞相關的功能特性上。

重要的是要注意，許多用於評估輔助性 T 細胞功能的檢測也依賴於特定細胞激素的分析，因為接受幫助的細胞可能被活化以產生細胞激素本身。

## B 細胞和 T 細胞增生試驗 (B-Cell and T-Cell Proliferation Assays)

裂殖素刺激的淋巴球活化，啟動了細胞內訊息傳遞，導致基因表達、蛋白質合成、細胞增生和分化，對於裂殖素刺激而產生的增生反應是多株的，根據定義，裂殖素是非特異性刺激，不透過抗原特異性受體，但裂殖素可以選擇性地刺激 B 細胞或 T 細胞族群，這就是裂殖素與僅活化表現適當抗原受體的淋巴球株落免疫原的不同之處，多株活化劑可刺激許多 B 或 T 細胞株落，且不管它們的抗原特異性如何，選擇性活化 B 細胞的裂殖素，例如：革蘭氏陰性菌細胞壁的脂多醣 (**lipopolysaccharide**，簡稱 **LPS**) 成分，可引起小鼠和人類 B 細胞的多株刺激；同樣地，幾種稱為凝集素 (**lectins**) 的醣結合蛋白，包括刀豆球蛋白 A (**concanavalin A**，簡稱 **Con A**) 和植物性血球凝集素 (**phytohemagglutinin**，簡稱 **PHA**)，是非常有效的 T 細胞裂殖素；商陸裂殖素 (**pokeweed mitogen**，簡稱 **PWN**) 是具有強大裂殖素特性的另一種凝集素，與刀豆球蛋白 A 和植物性血球凝集素不同的是，商陸裂殖素刺激 B 細胞和 T 細胞的多株活化。

對於裂殖素刺激的細胞增生幅度可以通過添加顏色變化試劑 (比色測定) 或螢光試劑 (螢光測定) 標記的核苷來測量，較早的方法使用放射性標記的核苷，例如：氚標記的胸腺嘧啶 (**thymidine**)，來檢測細胞增生，因為在所有情況下，標記的核苷都會嵌入分裂細胞的 DNA 中。

## B 細胞產生抗體 (Antibody Production by B Cells)

B 和 T 細胞的裂殖素刺激導致許多細胞株落的增生和分化，因此對於 B 細胞，多株活化劑脂多醣或商陸裂殖素可用於評估 B 細胞群產生抗體的能力，酵素連結免疫吸附分析法 (**enzyme-linked immunosorbent assay**，簡稱 **ELISA**) 是最常用來進行抗體定量分析的檢測；或者，可以在體外用裂殖素或特定抗原刺激 B 細胞，直接在硝化纖維膜上培養，然後用酵素連結免疫斑點分析法 (**enzyme-linked**

**immunospot**，簡稱 **ELISPOT**) 測定，因為硝化纖維的蛋白質結合特性有助於捕獲單個 B 細胞分泌的抗體，這會產生與硝化纖維結合的離散抗體斑點，可以使用對結合抗體具有特異性的酵素標記二級抗體進行檢測，從而可以對抗體分泌細胞進行計數。

## T 細胞和自然殺手細胞的效應細胞檢測 (Effector Cell Assays for T Cells and Natural Killer Cells)

如上所述，所使用效應細胞測定的選擇取決於需要回答的問題，因此 T 細胞檢測的方法與已功能多樣的 T 細胞亞群一樣，非常多樣化，因此各種檢測 T 輔助細胞功能的測定法 (重點放在 B 細胞、巨噬細胞活化甚至其他 T 細胞的輔助活性) 可用於測量  $CD4^+$  T 細胞的輔助特性；類似地，也有幾種檢測  $CD8^+$  T 細胞毒殺功能的測定法，像是**毒殺試驗 (cytotoxicity assay)** 是檢測毒殺型 T 細胞殺死放射性標記的標的細胞的能力，這些標的細胞表達毒殺型 T 細胞會辨識的抗原；在另一個相關的檢測中，**自然殺手細胞 (natural killer cell)**、會結合到標的細胞的特異性抗體、放射性標記的標的細胞一起培養，這種方法的基本原理是基於自然殺手細胞表達與某些免疫球蛋白類型的 Fc 受體，透過 NK 細胞的一個重要功能特性，**抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，簡稱 ADCC)**。

## 細胞培養 (CELL CULTURE)

有多個實驗系統徹底改變了我們研究有關免疫系統發育、功能和調節特性以及與免疫缺陷和自體免疫疾病相關的病理機制的問題的能力，許多這些實驗系統仰賴於在體外維持細胞的細胞培養方法，細胞培養系統促進了多項重大科學突破，包括 1970 年代克勒 (Kohler) 和米爾斯坦 (Milstein) 開發的 **B 細胞融合瘤 (hybridoma) / 單株抗體技術 (monoclonal antibody technology)**，對維持淋巴細胞所需的生長因子的了解，使得人們能夠在體外培養具有功能的細胞，此外，重組 DNA 技術允許將基因轉移到這些培養的細胞中，從而使研究人員能夠回答與研究基因相關的許多問題，同樣地，重組 DNA 技術使開發基因工程免疫分子和受體成為可能，它們可以轉移到細胞中，然後用於研究受體表達和受體活化 (如配體結合) 的生物學反應。

這些體外系統的繼續使用持續增進我們對免疫系統的了解，並且在某些情況

下，用於開發新的生物療法和臨床使用的疫苗。

## 初代細胞培養和淋巴細胞株培養 (Primary Cell Cultures and Cloned Lymphoid Cell Lines)

與生物科學的許多其他領域一樣，細胞培養系統已成為一種重要的研究工具，有助於我們了解細胞的許多發育或成熟和生理特性。培養由異質 T 和 / 或 B 細胞群組成的初代淋巴細胞 ( 儘管時間有限 ) 的能力使免疫學家能夠研究控制 B 細胞和 T 細胞許多重要生物學特徵的生化和分子機制，包括基因重組，在過去的幾十年中，細胞培養系統的迅速發展，能夠使用多種方法推動細胞株落複製技術的發展，包括將細胞暴露於某些致癌物或病毒，例如：用於轉化 B 細胞的**愛潑斯坦－巴爾病毒 (Epstein-Barr virus，簡稱 EBV，也可稱作 EB 病毒、人類疱疹病毒第四型)**、用於轉化 T 細胞的**人類嗜 T 淋巴球病毒第一型 (human T lymphotropic virus 1，簡稱 HTLV-1)**，值得注意的是，許多細胞係源自於自發或實驗產生的腫瘤 ( 由於細胞暴露於致癌物質或某些病毒 )。

使用株落複製細胞株的主要優點是可以生成大量細胞用於研究，但使用致癌物或病毒轉化細胞的一個缺點是，根據定義，它們是異常的，事實上，許多轉化細胞的染色體數量異常，並且經常表現出正常細胞所沒有的表現型和功能特性，1970 年代後期，株落複製淋巴細胞的產生取得了重大進展，發現非轉化的抗原特異性 T 細胞和株落複製的抗原特異性 T 細胞可以在 T 細胞生長因子－**介白素 -2 (interleukin-2，簡稱 IL-2)** 加上抗原和抗原呈現細胞一起培養，這種方法與使用轉化細胞相比有幾個優勢，因為從這種培養系統中衍生的細胞，都是趨近於正常的，因此可以產生大量未轉化的抗原特異性 T 細胞用於研究，事實上，許多這些株落複製的 T 細胞系已被用於細胞激素的鑑定和生化分析，使得編碼這些蛋白質的基因也被成功複製出來。

細胞株落複製系統、基因轉移方法、動物模式的使用幫助我們了解淋巴細胞如何發展自身耐受性以及它們如何逃避耐受性誘導機製成為致病的自體反應性細胞，簡而言之，細胞培養系統已成為研究的重要工具，用於淋巴細胞的生理學和病理生理學特性，如下文將討論的，隨著許多有用的診斷和治療試劑 ( 如單株抗體 ) 的開發，細胞培養系統也得到了相當成效的開發。

## B 細胞融合瘤和單株抗體 (B-Cell Hybridomas and Monoclonal Antibodies)

免疫反應的特異性已成為血清學反應的基礎，其中抗體用於抗原的定性和定量檢測，然而血清抗體的鑑別力並非沒有限制，因為通常具有許多頂位的免疫抗原會導致產生含有對所有頂位具有不同特異性的抗體混合物的抗血清，即使針對單個頂位的抗體通常也是具有不同細微特異性的免疫球蛋白的混合物，因此對抗原決定位的親和力也不同，此外，用抗原進行免疫可以擴大各種抗體形成淋巴細胞的數量，這些細胞只能在培養基中維持很短的時間（幾天），因此培養正常細胞並獲得產生單一特異性抗體的株落即使不是不可能，但也是不切實際的。

單株抗體的技術使得抗體的分辨率和辨別力出現了大幅的進步，克勒和米爾斯坦因此共同獲得了諾貝爾獎，單株抗體是同質的抗體分子群，源自單個抗體產生細胞的後代，其中所有抗體都是相同的，並且對給定的頂位具有相同的精確特異性，在製備過程中，使用惡性非免疫球蛋白產生漿細胞（在細胞培養中永生），這些細胞被設計為缺乏一種酵素，次黃嘌呤－鳥嘌呤磷酸核苷轉換酵素 (**hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase**，簡稱 **HGPRT**)，因此除非將該酵素添加到細胞生長的培養基中，否則它們將無法在培養基中存活，這些細胞與來自最近用抗原免疫的小鼠（如脾臟細胞）的新鮮收穫的 B 細胞進行融合（雜交）（圖 20.5），融合通常通過使用聚乙二醇 (**polyethylene glycol**，簡稱 **PEG**) 來完成，融合後，細胞在缺乏次黃嘌呤－鳥嘌呤磷酸核苷轉換酵素的培養基中培養，由於產生抗體的 B 細胞也能夠產生次黃嘌呤－鳥嘌呤磷酸核苷轉換酵素，所以只有與 B 細胞融合的惡性漿細胞組成的融合瘤細胞才能在沒有次黃嘌呤－鳥嘌呤磷酸核苷轉換酵素的培養基中存活，幾天之內，非融合的惡性漿細胞死亡，所有非融合 B 細胞也是如此，那些合成特異性抗體的雜交細胞通過抗原反應性測試（如酵素連結免疫吸附分析法）來選擇，然後從單個細胞株落在組織培養中繁殖，每個株落都合成單一特異性的抗體，這些高度特異性的單株抗體具有多種應用價值，從特異性診斷測試到用於癌症免疫治療的生物製劑（見第 18 章）。

在免疫療法中，各種藥物或毒素可以與單株抗體結合，單株抗體又將這些物質運送到抗體特異性針對的腫瘤細胞。

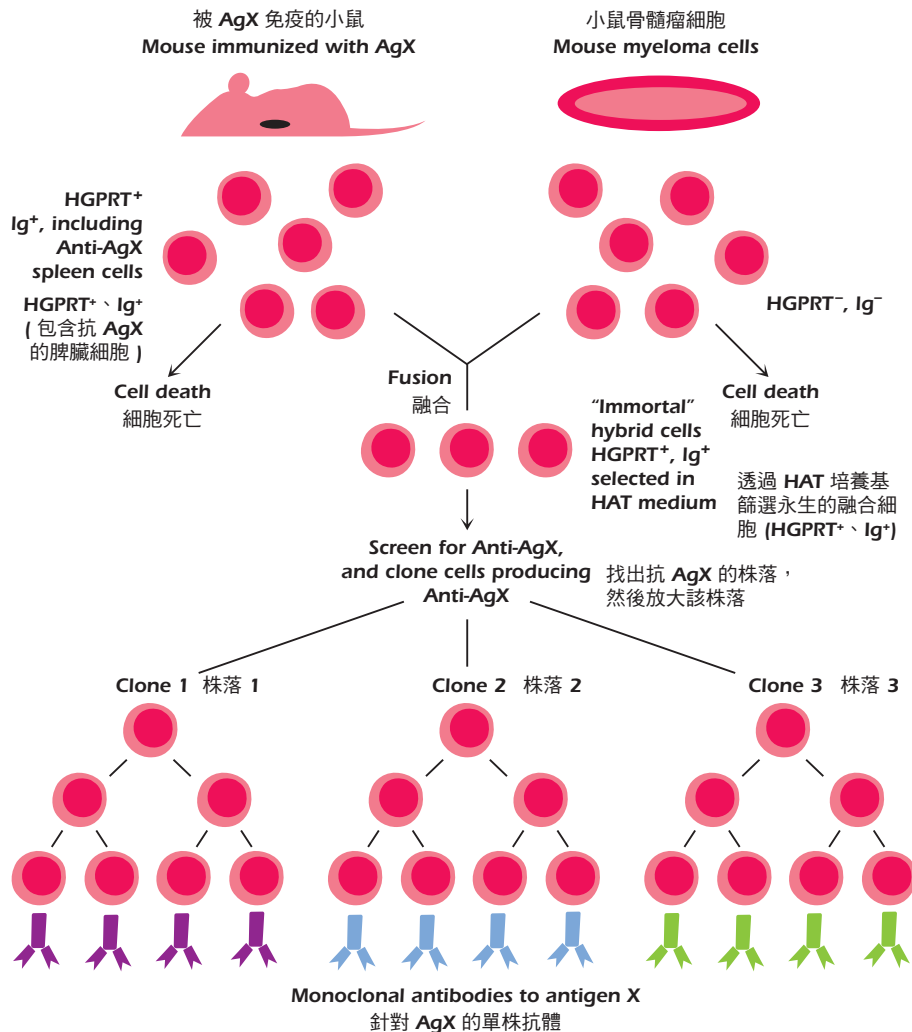


圖 20.5 單株抗體生產的示意圖。

## T 細胞融合瘤 (T-Cell Hybridomas)

值得注意的是，融合瘤技術並不局限於單株抗體的生產，在 20 世紀 70 年代後期，還為 T 細胞開發了產生融合瘤的方法，將惡性 T 細胞與非惡性的抗原特异性 T 淋巴細胞融合。T 細胞融合瘤可用於研究單一特异性 T 細胞與其相應頂位之間的關係。

## 基因工程分子和受體 (Genetically Engineered Molecules and Receptors)

目前大多數單株抗體是在小鼠細胞中製備的，這些抗體適用於診斷和許多其他

目的，然而，將它們施打於人體會帶來並發症，即患者會形成針對小鼠免疫球蛋白的抗體，換句話說，開發體外人類單株抗體的嘗試並不十分成功。

目前有幾種方法通過基因工程生產人類單株抗體，一種方法是利用重組 DNA 技術生產嵌合小鼠－人類單株抗體，這些所謂的人類化抗體，由人類免疫球蛋白的恆定區和小鼠免疫球蛋白的可變區組成，還有一個類似的方法由人類抗體恆定區以及由小鼠高變區和人框架區所組成的可變區而形成的人類化抗體，另一種方法利用聚合酶連鎖反應 (**polymerase chain reaction**，簡稱 **PCR**) 從融合瘤細胞或漿細胞獲得的 DNA 產生重鏈和輕鏈的基因庫，隨機連接許多重鏈和輕鏈，並篩選產生的 Fab 構建體以檢測針對所需抗原的抗體活性，有了這些技術，現在人們可以產生數百萬個不同特異性的株落，快速篩選它們以獲得所需的特異性，並在無需免疫的情況下生成所需的單株 Fab 構建體，並且不會遇到單株抗體生產中遇到的困難，尤其是人類單株抗體抗體。

免疫蛋白的基因工程並不局限於單株抗體的生產，許多編碼在淋巴細胞和非淋巴細胞上表達的膜受體的基因已經被複製，並且在某些情況下，基因工程允許將基因轉移到通常不表達這些受體的細胞中，某些共同刺激分子的表達促進了細胞間的交互作用，例如：毒殺型 T 細胞目標細胞之間的物理接觸，導致後者被殺死)，通過基因轉移，這種共同刺激分子 (如 B7) 在腫瘤細胞上的表達顯著增強了 T 細胞識別和殺死這些細胞的能力，實驗性疫苗接種策略 (免疫療法的一種形式) 已經證明，用自身的腫瘤細胞 (已 B7 轉染基因) 對長腫瘤動物進行免疫接種，可以增強 T 細胞識別和破壞腫瘤細胞的能力，另一方面，轉染某些細胞激素基因的腫瘤細胞的策略也已在動物模式中取得了一些成功。本書多章討論了用於治療多種疾病的免疫治療策略 (見第 16~18 章)。

## 細胞死亡的測定 (Assays of Cell Death)

正常的免疫反應最終會回到平衡，在適應性免疫反應的情況下，一些活化的 B 細胞和 T 細胞會成為未來抗原特異性反應的記憶細胞，而大多數反應細胞由於細胞凋亡或壞死而死亡，凋亡細胞通常被鄰近細胞和巨噬細胞吞噬，此外，如前幾章所述，感染後許多免疫反應的結果是受感染或受影響的細胞死亡。

由細胞凋亡 (和壞死) 引起的細胞死亡伴隨著某些特徵，表現為細胞膜、細

胞質、細胞核和粒線體的特定改變，形態學變化的特徵包括細胞質和細胞核的濃縮、DNA 片段化、胞器的解離以及細胞膜的破壞，細胞凋亡的生化變化包括細胞膜磷脂醯絲胺酸 (**phosphatidylserine**，簡稱 **PS**) 外翻以及膜聯蛋白 **I** (**annexin I**)、鈣網蛋白 (**calreticulin**) 在細胞表面的暴露，加上細胞質中細胞色素 **c** (**cytochrome c**) 的增加，凋亡蛋白酶 (**caspases**) 作為啟動細胞凋亡途徑的蛋白質，因為作為酶原 (**zymogens**) 存在的促細胞凋亡蛋白被水解活化，活化後它們就會作為半胱胺酸蛋白酶 (細胞凋亡的主要驅動因素) 發揮作用，切割對分解垂死細胞至關重要的細胞蛋白，此外，凋亡蛋白酶活化的去氧核糖核酸酶 (**caspase-activated DNase**，簡稱 **CAD**，一種凋亡蛋白酶依賴性核酸內切酶) 將染色體 DNA 切割成核小體片段，這些片段可以在瓊脂膠體 (**agarose gel**) 上檢測到，並呈現出 DNA 階梯狀。

除此之外，尚有多種其他更定量的方法可用於檢測細胞凋亡，包括：(a) 凋亡蛋白酶活化測定；(b) 通過結合磷脂醯絲胺酸的能力對凋亡細胞進行膜聯蛋白 **V** (**annexin V**) 染色，磷脂醯絲胺酸外翻是細胞凋亡的標誌物；(c) 與細胞膜損傷相關的細胞乳酸去氫酶 (**lactate dehydrogenase**) 釋放；(d) 末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記 (**terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling**，簡稱 **TUNEL**) 測試，這些技術中的每一種都有優點和缺點，完整的討論超出了本章的範圍，下面以方法以末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記測定說明 DNA 片段化的檢測。

末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記測試使用末端去氧核苷酸轉移酶 (**terminal deoxynucleotidyl transferase**，簡稱 **TdT**) 將鹼基添加到 DNA 序列的斷裂末端，在經典測定中，末端去氧核苷酸轉移酶催化溴化去氧尿苷 (**bromodeoxyuridine**，簡稱 **BrdU**) 添加到固定的通透化細胞 (圖 20.6b) 中新合成的 DNA (圖 20.6a) 中，最後加入螢光抗溴化去氧尿苷抗體以檢測與 DNA 結合的溴化去氧尿苷 (圖 20.6c)，然後可以使用螢光顯微鏡 (圖 20.7) 或流式細胞術等方法對螢光凋亡細胞進行定量測量。

## 實驗動物模式 (EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS)

多種重要的動物模式已經被開發成功，其實驗價值和臨床效果與使用上述體外



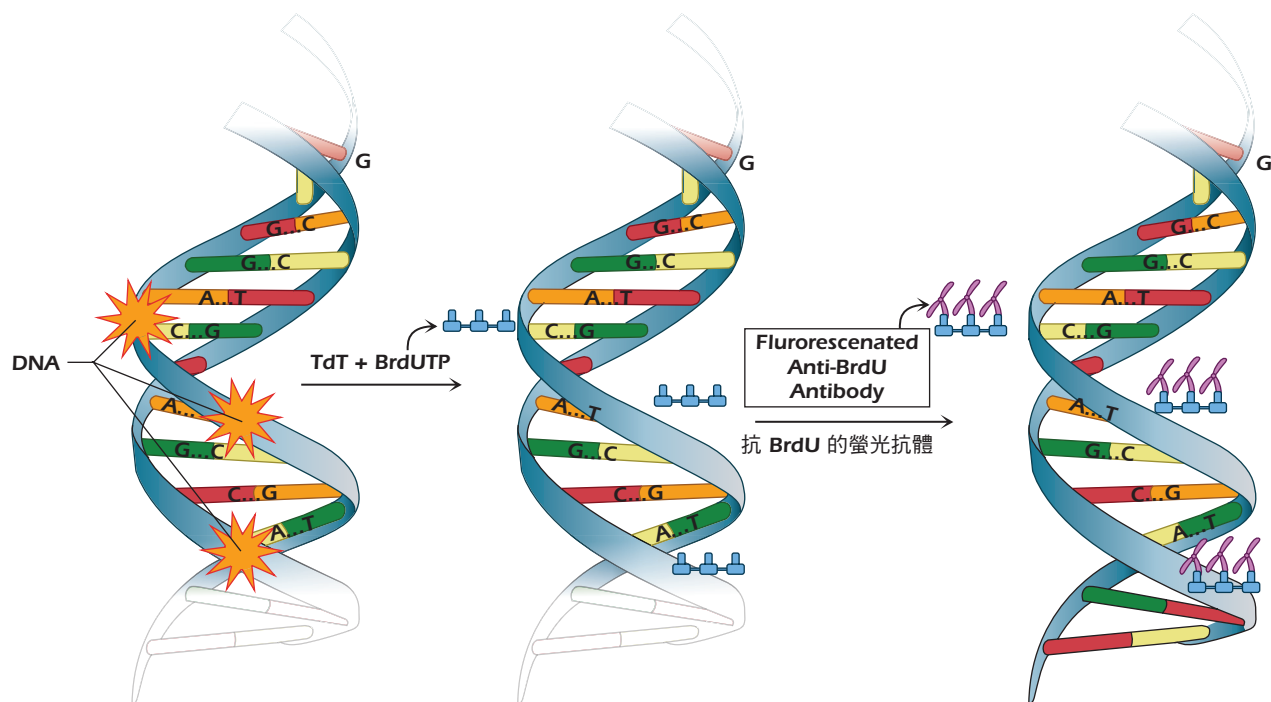


圖 20.6 使用 TUNEL 測試檢測細胞凋亡。資料來源：經萊富生命科技公司 / 賽默飛世爾科技 (www. thermofisher.com) 許可轉載。

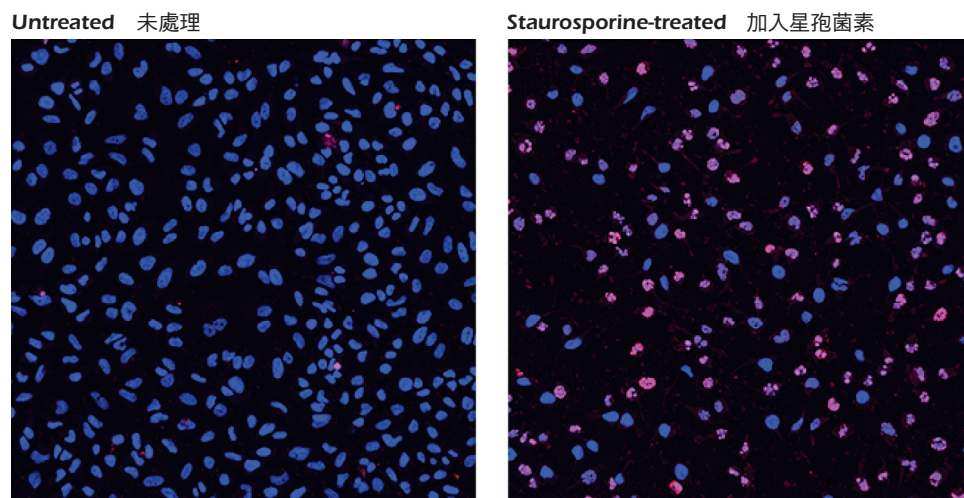


圖 20.7 TUNEL 細胞凋亡測定。用蛋白激酶抑制劑 (星孢菌素) 加入子宮頸癌細胞 (HeLa) 的培養基以誘導細胞凋亡。細胞核帶有 Hoechst 33342, 一種常用的核酸染色劑 (藍色)。使用 TUNEL 測試檢測凋亡細胞 (粉紅色)。資料來源：經萊富生命科技公司 / 賽默飛世爾科技 (www. thermofisher.com) 許可轉載。

系統產生的模型相似，這些體內系統仰賴於具有各種遺傳特徵的近親品系小鼠，其中一些是經過基因工程的改變，一些近親品系小鼠具有發展特定疾病的先天傾向，例如：乳癌 (**mammary cancer**)、白血病 (**leukemia**)、自體免疫疾病、嚴重複合型免疫缺乏症 (**severe combined immunodeficiency diseases**，簡稱 **SCID**)；另一方面，基因轉殖動物已經被開發為表達特定外源基因 (基因轉殖小鼠) 或通過干擾目標基因的表達 (基因剔除小鼠)，這些品系可用於研究特定轉基因的表達或確定基因剔除後的影響，我們首先討論動物的近親品系。

## 近親品系 (INBRED STRAINS)

免疫學領域的許多經典實驗都是使用小鼠、大鼠和天竺鼠等動物的近親品系進行，用同窩的幼仔進行選擇性近親交配超過 20 代通常會產生近親品系，動物近親品系的所有成員在遺傳物質上都是相同的，就像同卵雙胞胎一樣，他們因此被稱為同源的，在沒有與動物之間遺傳差異相關的變異的情況下，可以研究近親品系的免疫反應，正如第 17 章所討論的，近親品系成員之間的器官移植總是被接受的，因為它們的主要組織相容性複合體 (**major histocompatibility complex**，簡稱 **MHC**) 抗原是相同的。通過使用近親品系可以了解移植規律，因為主要組織相容性複合體是移植的主要遺傳障礙。使用近親品系的實驗使得人們鑑定出第一類和第二類主要組織相容性複合體基因，其主要功能是將抗原的肽片段運送至細胞表面，從而使它們能夠被抗原特異性 T 細胞辨識，在前面的章節詳細闡述了主要組織相容性複合體在 (1) 正常免疫反應的產生中的作用；(2) T 細胞發育；(3) 疾病易感性；(4) 器官移植。

## 細胞過繼轉移 (Adoptive Transfer)

與抗體介導的 (體液) 免疫相反，抗原特異性 T 細胞通過細胞介導的免疫來預防許多疾病。免疫反應的這兩個分支之間的區別可以通過 T 細胞的過繼轉移或抗血清或純化抗體的被動給予很容易地證明，T 細胞的過繼轉移通常使用基因相同的捐贈體和受贈體 (如近親品系) 進行，並在給予抗原引發長期的適應性免疫，相比之下，被動轉移含有抗體的血清可以跨越組織相容性複合體屏障進行，並且只要轉移的抗體在受贈者體內保持活性就有效，因此這種類型的轉移稱為被動免疫。

## 嚴重複合型免疫缺乏小鼠 (SCID Mice)

嚴重複合型免疫缺乏症是一種 B 細胞和 T 細胞無法正常發育的疾病，導致個體在淋巴防禦機制方面受到損害，在第 16 章討論了人類嚴重複合型免疫缺乏症的各種原因，在 1980 年代，一種近親品系小鼠會自然地發生體染色體隱性突變，導致同型合子 *scid/scid* 出現，並發展為嚴重複合型免疫缺乏小鼠，由於缺乏功能性 T 細胞和 B 細胞，嚴重複合型免疫缺乏小鼠能夠接受來自其他品系小鼠或其他物種的細胞和組織移植，像是嚴重複合型免疫缺乏小鼠可以植入人類造血幹細胞以產生嚴重複合型免疫缺乏小鼠－人類嵌合體，這種嵌合小鼠透過打入的人類幹細胞建立成熟的功能性 T 細胞和 B 細胞，這種動物模式已成為一種有價值的研究工具，因為它允許免疫學家在體內操縱人體免疫系統並研究各種淋巴細胞的發育，此外，嚴重複合型免疫缺乏症－人類小鼠可用於測試候選疫苗，包括那些可能有助於保護人類免受人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus, 簡稱 HIV) 感染的疫苗。

## 胸腺切除和先天性無胸腺 (裸) 小鼠 [Thymectomized and Congenitally Athymic (Nude) Mice]

胸腺在 T 細胞發育成熟中的重要性可以通過使用新生兒胸腺切除、輻射照射、然後用同源骨髓重建的小鼠來證明，這些小鼠無法發育成熟的 T 細胞，類似地，隱性基因 *nude* 突變的同型合子小鼠也無法發育出成熟的 T 細胞，因為該突變導致無胸腺 (無毛，因此稱為裸鼠) 表現型，在這兩種情況下，都可以通過將胸腺上皮組織移植到這些小鼠中來恢復 T 細胞的發育。與嚴重複合型免疫缺乏症小鼠一樣，這些動物模式可用於研究 T 細胞發育，由於不存在排斥此類外來細胞所需的 T 細胞，它們也可用於腫瘤細胞系、來自其他品系、其他物種的新鮮腫瘤外植體的體內繁殖。

## 轉基因轉殖小鼠和基因標定 (TRANSGENIC MICE AND GENE TARGETING)

### 基因轉殖小鼠 (Transgenic Mice)

另一個廣泛用於免疫學研究的重要動物系統是基因轉殖小鼠，基因轉殖小鼠是

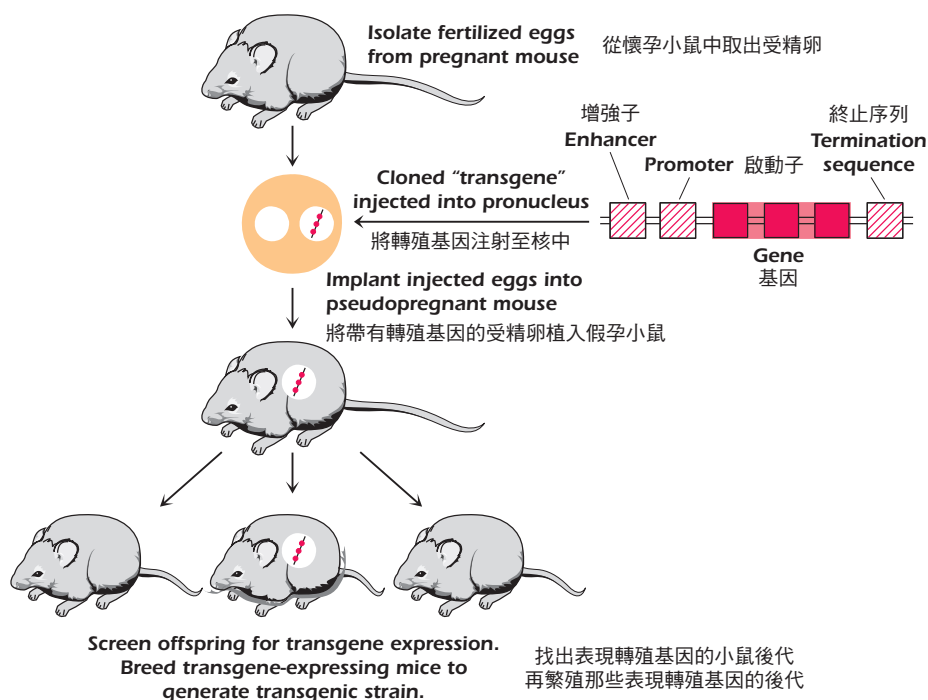


圖 20.8 生產基因轉殖小鼠的流程。

通過將外源基因 (轉殖基因) 注射到小鼠受精卵中而製成的，然後將受精卵顯微注射到假孕小鼠體內 (圖 20.8)，這種技術的成功率相當低，大約 10~30% 的後代表達轉殖基因，由於轉殖基因被整合到體細胞和生殖細胞中，它作為孟德爾性狀傳遞給後代，也可以通過構建具有特定啟動子的轉殖基因控制基因的表達，例如：一些啟動子僅在某些組織中起作用，像是胰島素啟動子僅在胰臟中起作用，而其他啟動子也應對其生化訊號的作用，在某些情況下，這些信號可以作為膳食補充劑提供，例如：金屬硫蛋白啟動子對應鋅的功能，可以將鋅添加到飲用水中。

基因轉殖小鼠已被用於研究通常不在體內表達的基因，例如：致癌基因，以及編碼特定免疫球蛋白分子、T 細胞受體 (T cell receptor, 簡稱 TCR)、第一類或第二類主要組織相容性複合體分子以及各種細胞激素，此外，人們還開發了特定的基因轉殖小鼠，使得整個小鼠免疫球蛋白基因座被人類免疫球蛋白基因取代，這些可用於在小鼠體內產生人類抗體。

轉殖基因方法的一個缺點是轉殖基因隨機整合至基因體中，這種局限性，加上在錯誤組織中表達大量轉殖基因是非生理學的，迫使研究人員在解釋基因轉殖小鼠

中獲得的結果時非常小心。

## 基因剔除和基因敲入小鼠 (Knockout and Knock-in Mice)

確定特定基因產物的去除如何影響免疫系統很有意義，使用基因標靶的方式可以用發生突變或被破壞的基因替換正常基因，從而產生所謂的基因剔除小鼠，與產生基因轉殖小鼠的方法不同，剔除小鼠表達的轉殖基因通過稱為同源重組的過程整合到特定的內源基因中，實際上，任何存在突變或改變的轉殖基因都可以通過這種方式進行標的，剔除小鼠是通過使用突變或改變的轉殖基因產生的，使得目標基因不表達，包括那些編碼特定細胞激素和主要組織相容性複合體分子的基因，它們還被用於鑑定正常基因功能所必需的基因部分，這是透過引入不同突變的基因至基因體後，觀察其功能變化。

基因敲入是指一種基因工程方法，涉及在生物體染色體的特定位置插入編碼蛋白質的 DNA 序列，CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 技術通常用作基因編輯工具，通常會用在小鼠身上，因為小鼠胚胎幹細胞很容易被操縱，敲入技術與基因轉殖技術的區別在於，敲入涉及將基因插入特定位置，因此是標靶插入，敲入技術通常用於創建疾病模型，使研究人員能夠研究例如控制被替換的天然基因表達的調節機制 (如啟動子) 的功能，這是通過觀察相關生物體的新表現型來完成的。

## 基因表達分析 (ANALYSIS OF GENE EXPRESSION)

### 用於評估基因表達的微陣列 (Microarrays to Assess Gene Expression)

微陣列 (microarray) 或基因晶片是同時檢查數千個基因表達強度的工具，微陣列包含數以千計的 DNA 片段，每個片段都有一個獨特的序列，以有序的排列方式附著在載玻片或其他表面上，這些 DNA 片段以互補 DNA (complementary DNA，簡稱 cDNA；通常長 500~5000 個鹼基對) 或寡核苷酸 (20~80 個鹼基對長) 的形式存在，可以用於代表整個基因，或者可以製備專門的微陣列，使用來自被認為特別感興趣的基因的 DNA。

為了進行微陣列分析，通常用參考樣本測試來自細胞或組織的總 mRNA (從所

有活性基因的轉錄中獲得的產物) 樣本, 以比較不同樣本之間的基因表達, 例如: 可以比較不同的細胞類型或組織, 可以比較處於不同分化階段的細胞, 或者可以將腫瘤細胞與其正常對應物進行比較, 目的是評估測試樣本中的差異基因表達, 添加到微陣列的樣本通常不是 mRNA, 而是總 mRNA 被反轉錄而成互補 DNA, 然後用螢光材料 (螢光染料) 標記, 不同顏色的螢光染料用於明確標記不同來源的 cDNA。

圖 20.9 說明了如何使用微陣列來比較淋巴腫瘤細胞群和正常細胞對應物中的基因表達, 紅色螢光染料用於標記實驗性腫瘤細胞互補 DNA, 綠色螢光染料用於從對照正常對應物製備的互補 DNA, 標記的互補 DNA 在微陣列上洗滌, 並允許通過與其配對片段的鹼基配對進行雜合, 將來自對照樣品和實驗樣品的互補 DNA 樣品本一起添加到微陣列中, 以便它們競爭結合到微陣列上, 未雜合的材料被沖走, 在配對發生的地方留下螢光訊號, 在雜合反應結束時, 微陣列被雷射光掃描以顯示紅

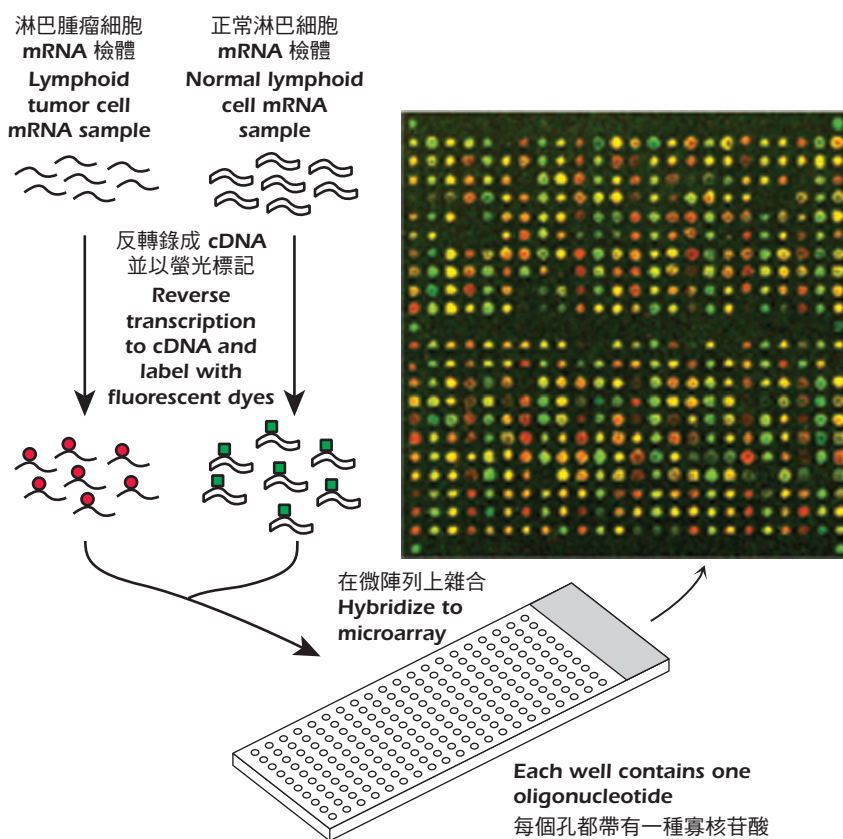


圖 20.9 比較來自淋巴腫瘤細胞和正常淋巴細胞的 mRNA 檢體的微陣列分析。

色、綠色或黃色斑點，表明實驗性腫瘤細胞互補 DNA 含量較高（在給定的示例中用紅色螢光染料標記），較高含量的控制組互補 DNA（標記為綠色），或兩個樣本（黃色）中的互補 DNA 含量相等，為了解釋結果，螢光掃描儀檢查載玻片上的每個點以獲得精確的螢光強度，然後通過電腦程式分析數據，該程式通常將螢光訊號與遺傳資料庫相結合，以確定哪些基因在測試樣本中過度表達或表達不足。

透過微陣列了解基因表達模式和強度在免疫學領域具有許多潛在用途，包括淋巴腫瘤的臨床診斷、藥物開發（如測試候選免疫抑制藥物對細胞激素基因表達的影響）和新基因發現。

## 重點整理

1. 固相免疫分析是一種利用許多蛋白質黏附在塑料上並形成單分子層的特性的測試。將抗原應用於塑膠孔盤，加入抗體，清洗孔，並使用放射性標記或酵素連結抗免疫球蛋白檢測與抗原結合的任何抗體。
2. 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 本質上是一種固相免疫分析，其中酵素與抗免疫球蛋白相連。定量是在添加基質後通過比色評估完成的，基質會根據酵素的作用改變顏色。
3. 免疫螢光染色是一種使用螢光標記的免疫球蛋白來檢測抗原的方法。在直接免疫螢光染色中，針對相關抗原的抗體帶有螢光標記。在間接免疫螢光染色中，抗原特異性抗體未被標記，它是通過加入螢光標記的抗免疫球蛋白來檢測的。流式細胞分選技術是可用於定量和分選螢光標記細胞的儀器。
4. 用於評估淋巴細胞功能的測定通常測量它們的增生反應或效應反應，例如：可以通過檢測 B 細胞增生和產生抗體應對 B 細胞裂殖素（如脂多醣）的能力來評估 B 細胞的功能。T 細胞通常通過測量它們為其他細胞提供幫助（在  $CD4^+$  細胞的情況下）或殺死帶有抗原的標靶（在  $CD8^+$  細胞的情況下）的能力來評估；此外，可以通過測量 T 細胞增生和產生某些細胞激素以應對 T 細胞裂殖素（如植物性血球凝集素或刀豆球蛋白 A）的能力來評估 T 細胞。
5. 單株抗體是高度特異性的試劑，由同質抗體群組成，所有抗體都對頂位具有完全相同的特異性。

## 本章習題

1. 基因轉殖小鼠和基因剔除小鼠之間的主要區別是：
  - A) 基因轉殖小鼠總是使用來自其他物種的轉殖基因
  - B) 基因轉殖小鼠具有外源基因，透過同源重組整合到目標位點上
  - C) 基因轉殖小鼠在其基因組中添加了功能性的外源基因
  - D) 基因剔除小鼠總是具有獨特的表型
2. 嚴重結合免疫不全症 (SCID) 小鼠具有一種遺傳缺陷，使其無法發育出功能性的：
  - A) 造血細胞
  - B) B 細胞和 T 細胞
  - C) T 細胞和自然殺手細胞
  - D) 多功能幹細胞
  - E) 骨髓細胞
3. 關於 B 細胞融合瘤 (B-cell hybridoma) 的陳述哪個是正確的？
  - A) 它們是能夠產生具有多種特異性免疫球蛋白的永生細胞系
  - B) 它們源於首先將 B 細胞轉殖並在細胞培養中短期生長的細胞
  - C) 它們含有兩個細胞核
  - D) 它們是由 B 細胞與無法分泌免疫球蛋白的惡性漿細胞融合而成
4. 以下哪種方法是用於使用螢光標記的抗體來檢測凋亡細胞？
  - A) 免疫分析
  - B) 凋亡蛋白酶活化測試
  - C) 末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記 (TUNEL)
  - D) 乳酸去氫酶 (LDH) 釋放試驗
  - E) 酵素結合免疫吸附分析法 (ELISA)
5. 臨床上以免疫學方法快速診斷新型隱球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 引起之感染，通常是直接偵測下列何者？
  - A) 腦脊髓液或血清中有無 *C. neoformans* 之細胞壁抗原
  - B) 腦脊髓液或血清中有無 *C. neoformans* 之細胞漿抗原



- C) 腦脊髓液或血清中有無 *C. neoformans* 之荚膜多醣體抗原  
D) 血清中有無 *C. neoformans* 之特異性抗體 [ 109-2 護理師 ]
6. 下列那種溫度可破壞補體的作用？  
A) 25°C  
B) 37°C  
C) 40°C  
D) 56°C [ 105-2 護理師 ]
7. 加熱攝氏 65 度，會讓血清中的補體失去活性，使用這種血清，將測不到那一種免疫反應？  
A) 沉澱反應  
B) 細胞溶解反應  
C) 中和反應  
D) 凝結反應 [ 103-2 護理師 ]
8. 根據 ABO 系統，血型 AB 型的病人是全能受血者，是因為其血漿中：  
A) 只有抗 A 抗體  
B) 只有抗 B 抗體  
C) 同時有抗 A 與抗 B 抗體  
D) 缺乏抗 A 與抗 B 抗體 [ 103-1 護理師 ]

